

Über simultane vierdimensionale Papierchromatographie,
ihre Anwendung zur Charakterisierung von aromatischen
und heterocyclischen Harninhaltsstoffen und von
Stoffwechselprodukten der Indoleessigsäure, sowie die
Chromogene der Uroroseinreaktion im Harn

Katharina Kikodse

Aus der II. Medizinischen Klinik der Universität München
Direktor: Universitätsprofessor Dr. Dr. G. Bodechtel

ÜBER SIMULTANE VIERDIMENSIONALE PAPIERCHROMATOGRAPHIE,
IHRE ANWENDUNG ZUR CHARAKTERISIERUNG VON AROMATISCHEN
UND HETEROCYCLISCHEN HARNINHALTSSTOFFEN UND VON
STOFFWECHSELPRODUKTEN DER INDOLESSIGSÄURE, SOWIE
DIE CHROMOGENE DER UROROSEINREAKTION IM HARN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Katharina Kikodse

aus

Tiflis/Georgien



München 1959

5349/60

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Prof. Dr. Dr. K. Dirr

Coreferent: Prof. Dr. Dr. G. Bodechtel

Dekan: Prof. Dr. K. Kolle

Tag der mündlichen Prüfung: 30. 6. 1959

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Einleitung	
Problemstellung	3
Methodik	4
Vorbereitung der Harne	4
Papierchromatographie	4
Papier	
Lösungsmittel	
Entwicklung der Papierchromatogramme durch Farbreaktionen	
Arbeitsgang	
Auswertung und Zuordnung der Farbflecke	6
 I. CHARAKTERISIERUNG AROMATISCHER UND HETEROCYCLISCHER HARNINHALTSSTOFFE DURCH SIMULTANE VIERDIMENSIONALE PAPIERCHROMATOGRAPHIE	7
Ergebnisse	9
Diskussion der Ergebnisse	14
Zusammenfassung	16
 II. ÜBER DEN STOFFWECHSEL DER INDOLESSIGSÄURE BEIM MENSCHEN	17
Ergebnisse	17
Diskussion der Ergebnisse	18
Zusammenfassung	20
 III. ÜBER DIE CHROMOGENE DER UROROSEINREAKTION IM HARN	20
Ergebnisse	21
Diskussion der Ergebnisse	21
Zusammenfassung	22
 Literaturverzeichnis	23



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555222_0134

EINLEITUNG

Durch die Empfindlichkeit der papierchromatographischen Methodik und ihre Anwendung bei der Auftrennung von Naturstoffgemischen ist eine Vielfalt von Inhaltsstoffen in biochemischen Materialien zugänglich geworden.

Infolge großer Zahl dieser in einem Papierchromatogramm gleichzeitig erfassbaren Substanzen erscheint jedoch die Charakterisierung durch zweidimensionale Papierchromatographie zu einer gesicherten Feststellung ihrer Individualität nicht ausreichend, da bei diesem Verfahren eine teilweise Überdeckung der Flecken, sowie andere Störungen nicht zu vermeiden sind.

Decker, Riffart und Oberneder (1) berichteten bereits 1951 über die "mehrdimensionale Papierchromatographie" (PC-graphie), eine pc-graphische Methode, die zur Analyse von Stoffgemischen geschaffen wurde, welche zur Erfassung durch zweidimensionale PC-graphie zu kompliziert zusammengesetzt sind. Wie sie ausführten, läßt sich ein mehrdimensionales Verfahren auf zwei verschiedene Arten durchführen: erstens, indem ein Gemisch zunächst eindimensional getrennt wird, die Fraktionen dann isoliert und jeweils für sich getrennt weiter fraktioniert werden. Für dieses successive Verfahren wurde eine Methodik zur Anreicherung von durch präparative eindimensionale PC-graphie getrennten Fraktionen angegeben. Es läßt sich auch in Kombinationen mit allen anderen Fraktionierungsverfahren anwenden z. B. Säulenchromatographie und kann auch mikropräparativen Zwecken dienen. Während dieses Verfahren relativ zeitraubend ist, da die Arbeitsgänge hintereinander durchgeführt werden, beruht das zweite mehrdimensionale Verfahren, welches als "simultane mehrdimensionale PC-graphie" bezeichnet wird, auf der gleichzeitigen Herstellung zweidimensionaler PC-gramme mit mehreren Kombinationen verschiedener Lösungsmittel. Durch die so gewonnenen zweidimensionalen Projektionen des mehrdimensionalen Systems kann dieses ebenso erschöpfend erfaßt werden wie etwa ein dreidimensionaler Körper durch Grundriß, Aufriß und Querschnitt. So kann aus einer Serie von zweidimensionalen PC-grammen, die mit allen möglichen Kombinationen von mehr als zwei Lösungsmitteln gefahren werden, eine sichere Zuordnung jeder Substanz auf Grund der Möglichkeit erfolgen die R_f -Werte auf den verschiedenen PC-grammen, die jeweils in einer der Dimensionen mit ein und demselben Lösungsmittel gefahren sind, miteinander zu vergleichen. Unter Verwendung der drei Kombinationen von je drei Lösungsmitteln wurde 1951 ein Verfahren zur sicheren Identifizierung der Aminosäuren angegeben (1).

Die papierchromatographische Untersuchung von aromatischen und heterocyklischen Harninhaltsstoffen und ihre erste Sichtung wurde von Decker (2, 3, 4), Decker und Sano (5) und Becke (6) im zweidimensionalen Verfahren vorgenommen. Unter denjenigen Chromogenen dieser Substanzenreihe, die mit Dimethylaminobenzaldehyd blaue Farbreaktion liefern, wurde Tryptophan und Indolelessigsäure nachgewiesen und durch Misch- und Parallelchromatogramme identifiziert.

Tryptophan und Indolelessigsäure, sowie Skatol und Indol wurden vor der papierchromatographischen Aera von Ellinger (7), Salkowski (8) u. a. als Glieder einer Abbaureihe des intermediären Stoffwechsels aufgefaßt, die unter Beteiligung der Intestinalflora erfolgt. Diese Auffassung, nach der also Indolelessigsäure als Abbauprodukt bzw. Stoffwechselprodukt des Tryptophans zu betrachten ist, konnte von Decker (3) nicht bestätigt werden. Auch wurde von Decker auf Grund seiner pc-graphischen Untersuchungen nach Fütterungsversuchen am Hund aufgezeigt, daß eine Vermehrung von Skatol nach Indolelessigsäuregaben bzw. von Indol und dessen Stoffwechselprodukten nach Skatolgaben im Harn nicht nachgewiesen werden kann. Hingegen verursacht die Zufuhr jeder der genannten Substanzen die Ausscheidung einer wohldefinierten Familie von Metaboliten im Harn, von denen diejenigen des Indols (Indikane) und eine Untergruppe derjenigen des Skatols (Indikanoide) beschrieben wurden (4).

Einzelne Glieder jeder dieser Familien finden sich jedoch auch ohne vorangegangene Belastung mit den Ausgangsstoffen im normalen Harn. Davon wurden die Tryptophanmetaboliten von Dagliesh und Mitarb. (9) charakterisiert.

An Skatolmetaboliten findet man nicht selten das bekannte "Skatolrot" (3) und regelmäßig ein weiteres Produkt, welches mit Ehrlich's Aldehyd eine rein blaue Färbung gibt und ausweislich des in allen Lösungsmitteln der Indoxylschwefelsäure ähnlichen pc-graphischen Verhaltens wahrscheinlich ebenfalls ein Schwefelsäureester d.h. wohl die bisher nicht einwandfrei charakterisierte Skatoxylschwefelsäure ist.

Auch Indol und Indolelessigsäure, sowie einige von deren Stoffwechselprodukten kommen im normalen Harn vor.

Nachdem auch bei Belastung mit großen Substanzmengen ein merklicher Übergang aus der Familie des Tryptophans in diejenige der Indolelessigsäure und ent-

sprechend weiter zu Skatol und Indol von Decker (3) nicht beobachtet wurde, zog er den Schluß, daß die Bildung jeder dieser Substanzen aus der Vorhergehenden in merklichem Masse weder durch die Darmflora noch im Rahmen des Abbaustoffwechsels erfolgt, da sie in diesen Fällen bei vermehrtem Angebot in vermehrtem Masse erfolgen müßte, was nicht der Fall ist. Falls die Mitglieder der Familie der Indolessigsäure, des Skatols und Indols überhaupt im Sinne der bisherigen Auffassungen einer Bildung aus Tryptophan ihr Vorkommen im Harn verdanken, so muß man sich diesen Übergang als wohl regulierte, vom Angebot an Ausgangsmaterial weitgehend unabhängige Reaktionskette vorstellen. Solche regulierten Stoffwechselwege lassen jedoch vermuten, daß unter den Zwischengliedern Substanzen mit biologischer Wirksamkeit zu suchen sind.

Als Chromogene der von Nencki und Sieber (10) entdeckten Uroroseinreaktion im menschlichen Harn wurde von Decker (3) pc-graphisch Indol-essigsäure, Skatolrot und eine weitere von ihm noch nicht identifizierte Substanz nachgewiesen. Der Nachweis dieser uroroseinpositiver Stoffe erfolgt durch Besprühen der PC-gramme mit salzsaurer Nitritlösung. Eine ebenfalls auf dem Papier ausführbare Farbreaktion stellt Ehrlich's Aldehydreaktion dar, welche dem Nachweis einer großen Zahl aromatischer und heterosyklischer Substanzen im Harn dient.

Sowohl Ehrlich's Aldehydreaktion wie auch die Uroroseinreaktion wurden bei der erneuten pc-graphischen Aufschlüsselung der Harninhaltsstoffe in der vorliegenden Arbeit angewandt.

PROBLEMSTELLUNG

Das Ziel dieser Arbeit war die im menschlichen Harn enthaltenen aromatischen und heterocyclischen Substanzen durch simultane vierdimensionale Papierchromatographie näher zu charakterisieren und die Stoffwechselprodukte der Indol-essigsäure, sowie die Chromogene der Uroroseinreaktion im Harn mittels chromatographischer Analyse zu erfassen.

METHODIK

Die Vorbereitung der Harne:

erfolgte nach der von D e c k e r (2,3,4) angegebenen Vorschrift:

15 ml Harn werden mit einigen Tropfen Eisessig angesäuert, mit 200 mg Carbo med. "Merck" und etwa ebensoviel Kieselgur versetzt, umgeschüttelt, auf einer kleinen Nutsche abgesaugt und mit etwas Wasser nachgewaschen. Das farblose Filtrat wird verworfen. Die Kohle wird mit 10-15 ml eines heissen Gemisches von 75 Teilen Wasser, 10 Teilen konz. Ammoniak, 10 Teilen Butanol und 5 Teilen Metanol eluiert. Das gelbbare Eluat wird auf einem Wasserbad fast bis zur Trockene eingedampft und mit ca 0,15 ml Wasser aufgenommen. Das so gewonnene Konzentrat wird in der weiter unten angegebenen Weise der pc-graphischen Analyse zugeführt.

Auf diese Weise werden die störenden Salze eliminiert und die aromatischen und heterocyklischen Bestandteile angereichert.

Zur serienweisen Sichtung der Harnchromogene bewährte sich auch die Extraktion der mit Essigsäure angesäuerten Harne mit Essigester und eindimensionales Fahren der eingedampften Extrakte in Parallel-PC-grammen. Bei der Extraktion mit Essigester gehen vorwiegend Substanzen in Lösung, welche in Isopropylalkohol-Eisessig Rf-Werte oberhalb 0,5 haben.

Papierchromatographie:

Es wurde die aufsteigende Methode von Williams und Kirby (11) angewandt, wobei zu Zylindern gerollte Bögen in Petrischalen unter Glasglocken, wie auch nebeneinander an Glasstäben aufgehängte Bögen in größeren Glasaquarien verwendet wurden. Einer Verdunstung des Lösungsmittels in den Aquarien wurde dadurch begegnet, daß ihr plangeschliffener Rand durch Spiegelglasplatten verschlossen wurde. Die Arbeit in Glasaquarien ist im Vergleich zu derjenigen mit aufgestellten Zylindern zeit- und raumsparend, besonders wenn eine Vielzahl von PC-grammen im gleichen Lösungsmittelgemisch gefahren werden soll.

entfernt - aufgetragen und luftgetrocknet. Der Bogen wird darauf in der oben angegebenen Weise so aufgestellt bzw. aufgehängt, daß sein unterer Rand etwa 1,5 cm tief in das Lösungsmittel taucht. Die "Laufzeit" (Aufsaugen des Lösungsmittels im Papierbogen bis zum oberen Rand) beträgt bei der gewählten Größe des Bogens je nach Lösungsmittel ca. 8-12 Stunden. Nachdem der Bogen in einem Lösungsmittel gefahren ist (I. Dimension) wird er luftgetrocknet und im zweiten Lösungsmittel gefahren (II. Dimension), wobei er jetzt um 90° gedreht aufgestellt bzw. aufgehängt wird - d.h. im rechten Winkel zur I. Dimension; wiederum luftgetrocknet, wird der Bogen nunmehr der Farbreaktion unterworfen.

Beim Nachweis der uroroseinpositiven Substanzen (Abschnitt III dieser Arbeit) wurde zweidimensional mit den Lösungsmitteln I und II gefahren.

Bei der Charakterisierung der Ehrlichpositiven Substanzen mittels simultaner vierdimensionaler PC-graphie (Anschnitt I und II dieser Arbeit) wurden alle vier angeführten Lösungsmittel verwendet und zwar in den sechs möglichen Kombinationen:

- | | | |
|-----------|----------|-----------|
| 1) I/II | 2) I/III | 3) I/IV |
| 4) III/II | 5) IV/II | 6) III/IV |

als jeweils erste und zweite Dimension.

Mit diesen sechs Kombinationen der vier Lösungsmittel wurden somit von jedem Kohleeluat sechs verschiedene zweidimensionale PC-gramme hergestellt.

Auswertung und Zuordnung der Farbflecke:

Zur Auswertung werden die sechs zweidimensionalen PC-gramme, die mit sechs Kombinationen der aufgeführten vier Lösungsmittel in der oben angegebenen Reihenfolge der beiden Dimensionen gefahren wurden, gemäß Schema Abb. 2 so gelegt, daß jeweils Lösungsmittel I und Lösungsmittel II auf drei neben- bzw. untereinander liegenden Bögen in der gleichen Richtung gelaufen ist; auf diese Weise korrespondieren die Rf Werte gemäß der durchgezogenen Hilfslinien. Um auch Lösungsmittel III und Lösungsmittel IV in den drei diese enthaltenden Kombinationen parallel nebeneinander in der gleichen Richtung zu haben, muß man sich das links und das oben liegende PC gramm jeweils um 90° um die rechte untere Ecke nach links bzw. nach rechts geklappt denken. Dies wird im Diagramm der

Abb. 2 durch die Kreisbögen der Hilfslinien angedeutet. Die Hilfslinien stellen die Orte aller Substanzen dar, die in den rechtwinklig zu ihnen gelaufenen Lösungsmitteln gleiche Rf-Werte aufweisen. Die Tatsache, daß Rf-Werte in der Praxis ein wenig streuen, wird im Schema dadurch angedeutet, daß die Hilfslinien von einem PC-gramm zum nächsten entsprechend versetzt gezeichnet sind, ausweislich markanter und unverwechselbarer Leitsubstanzen, an welchen es in biologischen Gemischen in der Regel nicht fehlt. Auf diese Weise erscheint jede der Substanzen auf insgesamt sechs zweidimensionalen, unabhängigen PC-grammen mit jeweils verschiedenen Lösungsmittelkombinationen. Der Rf-Wert in jedem der Lösungsmitteln kann dabei jeweils aus drei verschiedenen PC-grammen entnommen werden, an denen das betreffende Lösungsmittel in Kombination mit jeweils einem anderen der drei übrigen beteiligt ist.

I. CHARAKTERISIERUNG AROMATISCHER UND HETEROCYKLISCHER HARNINHALTSSTOFFE DURCH SIMULTANE VIERDIMENSIONALE PAPIERCHROMATOGRAPHIE

Unter den aromatischen und heterocyklischen Harninhaltsstoffen, die durch Adsorption an Kohle sehr leicht von Salzen, Aminosäuren und Zuckern getrennt dargestellt werden können, befindet sich eine große Anzahl von Substanzen, welche mit Ehrlich's Aldehyd blaue, rote oder gelbe Reaktionsprodukte geben. Die Auftrennung dieser Substanzserie mittels zweidimensionaler PC-graphie erfolgte seinerzeit durch Decker und Mitarb. (2-6). Die Ergebnisse dieser ersten Sichtung werden hier in Abb. 1 wiedergegeben. Im Verlauf dieser Untersuchungen wurden, wie aus der Abb. 1 ersichtlich, derart komplizierte Stoffgemische aufgedeckt, daß eine erneute Sichtung der Harninhaltsstoffe und ihre nähere Charakterisierung durch ein mehrdimensionales pc-graphisches Verfahren angezeigt schien.

In der vorliegenden Arbeit wird in Anlehnung an das von Decker, Riffart und Oberneder (1) angegebene, "dreidimensionale" Verfahren ein simultanes vierdimensionales Verfahren ausgearbeitet.

Auf Grund der vierdimensionalen Methodik war es möglich, die meisten der früher nachgewiesenen Substanzen und eine Anzahl weiterer früher noch nicht beschriebener, jetzt wesentlich genauer pc-graphisch zu differenzieren, indem jede Substanz in insgesamt sechs zweidimensionalen PC-grammen mit den Kombinationen von vier Lösungsmitteln durch vier Rf-Werte charakterisiert wurde.

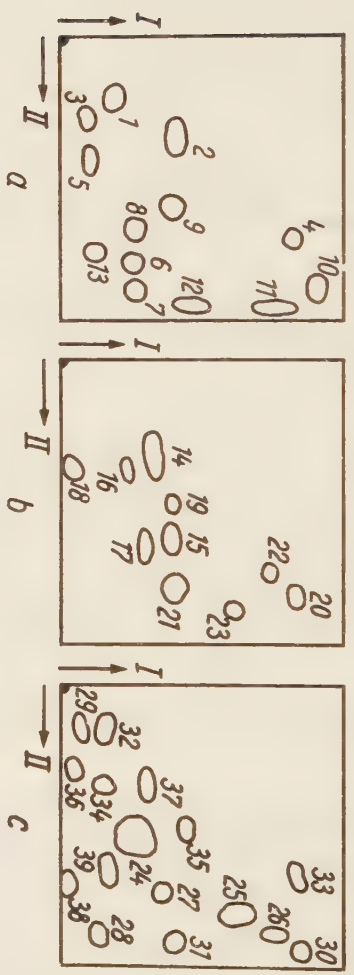


Abb. 1

Positionen von Substanzen aus normalen und pathologischen Harnen in 2dimensionalen Papierchromatogrammen, die mit Dimethylaminobenzaldehyd rotviolette bis blaue (a), rote oder braune (b) (davon Nr. 14, 15 und 23 braun) und gelbe (c) Farbreaktion geben. Lösungsmittel I: Butanol ammoniakgesättigt, II: Isopropylalkohol-Eisessig-gemisch

ERGEBNISSE

Abb. 3 zeigt die Positionen von 42 aromatischen und heterocyklischen Substanzen, welche blaue, rote oder gelbe Farbreaktion mit Dimethylaminobenzaldehyd (Ehrlich's Reagens) geben und die in vier ausgewählten, vorwiegend pathologischen Harnen, nach dem simultanen vierdimensionalen Verfahren nachgewiesen wurden.

Die Zuordnung der Flecke nach dem in Abb. 2 angegebenen Schema gelingt bei fast allen 42 Substanzen unter Berücksichtigung der Rf-Werte, des Farbtons und der Entwicklung dieses Farbtons im Verlauf der Zeit. Dabei ist dort, wo im betreffenden PC-gramm in wenigstens einem der vier Harnen der betreffende Fleck isoliert oder teilweise neben den ihn überdeckenden Flecken deutlich erkennbar war, der Punkt ausgefüllt gezeichnet; die nicht ausgefüllten Punkte stellen Substanzen dar, die infolge Überdeckung durch benachbarte Substanzen in keinem der betreffenden vier PC-grammen erkennbar waren und deren Soll-Position nur aus den mit anderen Lösungsmittelkombinationen gefahrenen PC-grammen abgeleitet wurde. Konnte in einigen wenigen Fällen der Rf-Wert in analoger Weise nur für eines der Lösungsmittel ermittelt werden, so wurde dieser mit einem Pfeil am Diagrammrand angezeigt (s. die Diagramme I/II, I/III u. I/IV der Abb. 3, Substanzen Nr. 5a und 29 d). Aus den Diagrammen der Abb. 3 ist zu ersehen, daß jede der Substanzen in mindestens einigen der zweidimensionalen Kombinationen soweit isoliert nachgewiesen werden konnte, daß an ihrer Individualität nicht zu zweifeln ist.

In Tab. 1 werden als Beispiel die Rf-Werte einer der Substanzen (Nr. 1 = Tryptophan) wiedergegeben, so wie sie aus den sechs jeweiligen PC-grammen auch bei allen anderen festgestellten Substanzen entnommen werden konnten.

In Tab. 2 sind die im gleichen Verfahren ermittelten Rf-Werte sämtlicher nachgewiesener Substanzen zu Mittelwerten zusammengefaßt; in Fällen, wo die Abweichungen der Rf-Werte in den einzelnen Lösungsmitteln mehr als 0,1 betrugen, wurden statt der Mittelwerte die gefundenen Extremwerte aufgeführt.

In Abb. 4 ist in einem I/II-Diagramm (zweidimensionales PC-gramm mit den Lösungsmitteln I und II) die Serie von Substanzen herausgezeichnet, welche zu den normalen Harnbestandteilen zählen und in fast jedem Harn zu finden sind; während in Abb. 5 eine Reihe von Substanzen zusammengestellt sind, welche sich in den untersuchten Harnen nur gelegentlich fanden und die z. T. sicher als

pathologisch anzusprechen sind, z. T. aber auch der individuellen Variabilität der Ausscheidungsmuster ihr Vorkommen verdanken.

Die Abb. 4 und 5 basieren auf der erneuten Sichtung von 140 Harnen in dem Lösungsmittelsystem I/II.

Beim Besprühen der PC-gramme kommen als erste Flecke Indikan (Nr. 14) mit brauner und Harnstoff (Nr. 24) mit gelber Farbe heraus. Im Laufe von 20-60 Minuten erscheint die Mehrzahl der blauen Flecke, welche z. T. später wieder ausbleichen. Eine Anzahl dieser Flecke erscheint zunächst mit rotvioletterm Farbton, dann werden einige von ihnen im Verlauf von Stunden, andere erst nach Tagen blau oder blauviolett. Die übrigen gelben Flecke kommen erst später heraus; eine Anzahl von ihnen ist nach 12 - 24 Stunden gut sichtbar, einzelne erscheinen jedoch erst nach 2-7 Tagen. Daher sind die Bögen nach dem Besprühen im Verlauf der ersten Stunde laufend zu überwachen und nach ein, zwei, sowie acht Tagen ergänzend auszuwerten.

Als Bezeichnung wurde die seinerzeit von Decker (3) und Becke (6) gewählte Numerierung (s. Abb. 1) beibehalten, um jederzeit darauf Bezug nehmen zu können und wo es erforderlich war, durch Zusatz kleiner lateinischer Buchstaben erweitert.

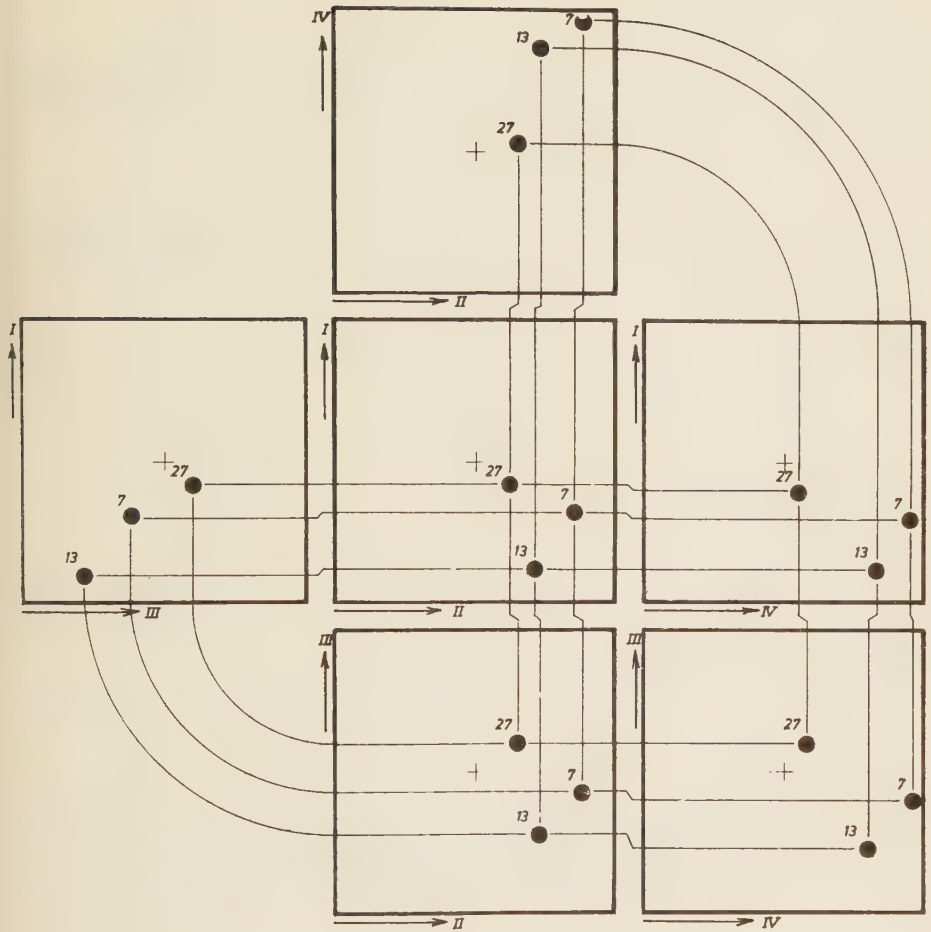


Abb. 2

Zuordnungsschema zum Vorgang der simultanen mehrdimensionalen PC-graphie mit vier Dimensionen, d.h. den sechs Kombinationen aus je vier Lösungsmitteln gemischt mit je sechsfacher unabhängiger Sicherung der Individualität und je dreifacher Sicherung der Rf-Wertbestimmung für jede Substanz. Die Hilfslinien stellen den Ort aller Substanzen dar, die in dem im rechten Winkel zu ihnen gelaufenen Lösungsmittel gleiche Rf-Werte zeigen. Originalgetreue Umzeichnung unter Andeutung der Rf-Wert-Abweichungen zwischen den einzelnen PC-grammen

TABELLE 1

Lösungsmittelpaar	Rf = Wert · 10 ² im Lösungsmittel			
	I	II	III	IV
I/II	11	18		
I/III	12		28	
I/IV	12			25
III/II		25	28	
IV/II		27		27
III/IV			25	25

Rf-Werte von Nr. 1 (Tryptophan), wie sie aus den sechs zweidimensionalen PC-grammen mit den im Text angegebenen Lösungsmittelkombinationen nach Schema Abb. 2 entnommen wurden.

TABELLE 2

Rf-Mittelwerte $\cdot 10^2$ von 42 Substanzen, die in vier vorwiegend pathologischen Harnen nach der beschriebenen Methodik ermittelt wurden.

Fleck Nr.	Rf-Mittelwerte $\cdot 10^2$ im Lösungsmittel				Farbe gleich nach Besprühen bzw. später	Konstitution od. Beziehung z. Stoffwechsel
	I	II	III	IV		
1	12	23	27	26	rv---v---b	Tryptophan
1a	9	20	33	27	ro	unbekannt
2	35	33-46	67	68	rv---b	"Skatolblau"++)
3	10	29	23-34	24	rv	unbekannt
4	74	79	76	95	rv---b	Indolessigsäure
5a	ø ⁺	42	40	37	rv---b	Metabolit
5g	3	20	12	18	b	unbekannt
6	22	81	44	40-60	rv---b	unbekannt
7	30	87	41	96	rv---b	Indolessig- säure
8	11	63	34	24	rv---b	Indolessigsäu- re Metabolit
8a	11	42-60	40	12-25	ro	unbekannt
10	90	91	91	96	rv---b	Indolessigsäu- re Metabolit
10a	100	98	95	100	rv	Indol (?)
13	11	72	24	83	b	unbekannt
14	30	37	60	62	rbr---br	Indikan
14a	28-48	52	55-66	50	hbg	unbekannt
15	32	59	63	60	ok	unbekannt
16	13	33-52	43	30	ro	unbekannt
17a+b	18	76	38	a. 32-52	lro	unbekannt
				b. 40-55	lro	unbekannt
21	32	88	33	97	rv	"Skatolrot"
21a	30	92	54	33-58	rv	unbekannt

++) vermutlich Skatoxylschwefelsäure

+) ø verdeckt durch Nachbarflecken

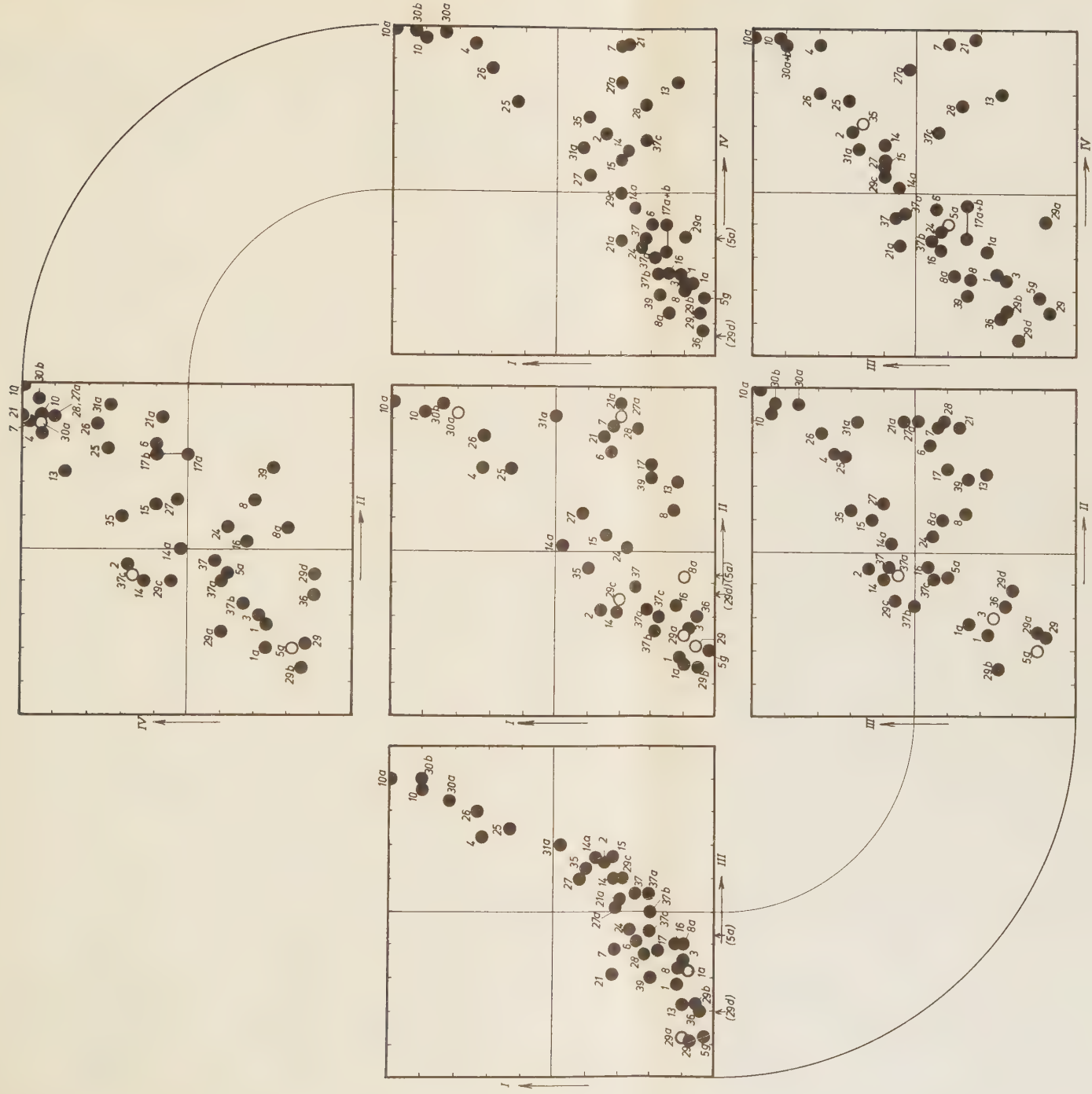


Abb. 3

Positionen von 42 nach dem Vorgang der simultanen vierdimensionalen PC-graphie (vergl. Abb. 2) mit sechs Kombinationen von vier Lösungsmitteln in vier vorwiegend pathologischen Harnen ermittelten Substanzen. Originalgetreue Umzeichnung.

FORTSETZUNG VON TAB. 2

Fleck Nr.	RF-Mittelwerte $\cdot 10^2$ im Lösungsmittel				Farbe gleich nach Besprühen bzw. später	Konstitution od. Beziehung z. Stoffwechsel
	I	II	III	IV		
24	26	54	43	36	y	Harnstoff
25	63	78	73	77	y	unbekannt
26	72	86	80	78	y	unbekannt
27	41	64	60	55	y	unbekannt
27a	30	90	51	87	y	unbekannt
28	23	89	38	77-90	y	unbekannt ⁺⁺⁺
29	7	23	10	14	y	unbekannt
29a	10	25	11	39	y	Allantoin (?)
29b	6	14	23	14	y	unbekannt
29c	30	33	59	53	y	unbekannt
29d	Ø	40	19	8	y	unbekannt
30a	83	92	87	96	(y)	unbekannt
30b	89	95	91	96	(y)	unbekannt
31a	47	91	69	66	l-y	unbekannt
35	40	45	67	71	ok-y	unbekannt
36	5	33	22	11	yy	unbekannt
37	24	44	57	40	yy	unbekannt
37a	20	36	54	30-43	ok	unbekannt
37b	19	31	49	31	y	unbekannt
37c	20	30-46	44	66	br-y	unbekannt
39	19	73	33	21	(y)	unbekannt

+++) Position der Anthranilsäure

Abkürzungen der Farben:

ro	=	rosa	rbr	=	rotbraun
lro	=	lachsrosa	br-y	=	braungelb
r	=	rot	y	=	gelb (yellow)
rv	=	rotviolett	or-y	=	orange gelb
v	=	violett	l-y	=	lachs gelb
bv	=	blauviolett	yy	=	stark gelb
b	=	blau	(y)	=	hellgelb
hbg	=	hellblaugrün	ok-y	=	okergelb
br	=	braun	ok	=	oker

DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Die Rf-Werte sind bekanntlich ohne besondere Kautelen, auch bei dem aufsteigenden Verfahren, das hier angewandt wurde, nicht ganz genau reproduzierbar. Für die Wiedererkennung einer Substanz auf zweidimensionalen PC-grammen kommt es aber nicht so sehr auf die absolute Größe ihres Rf-Wertes an, sondern auf die relativen Beziehungen ihrer Position zu den Positionen benachbarter Substanzen. Aus diesem Grunde werden in Abb. 3 die Positionen der einzelnen Substanzen als originalgetreue Umzeichnung aus den PC-grammen wiedergegeben. Da jedoch hierin Flecken aus insgesamt vier Chromatogrammen verschiedener Harnе zusammengefaßt wurden, ist diese Zusammenfassung so vorgenommen worden, daß jeweils das PC-gramm eines der vier Harnе zur Grundlage gemacht wurde. Flecken, die in diesen PC-gramm nicht, jedoch in den entsprechenden PC-grammen der anderen Harnе vorkamen, wurden in dieses erste PC-gramm unter Berücksichtigung der gegenseitigen Lage der Flecke hineinprojiziert und erst daraus der Rf-Wert entnommen. Die Positionen jedes Fleckes in Bezug auf seine Nachbarn sind auf diese Weise in jedem Fall richtig wiedergegeben.

Mit Ausnahme der Substanzen Nr. 5, 9, 11, 12, 18, 19, 20, 22, 23, 30, 32, 33 und 34 in Abb. 1 konnten alle dort angegebenen Substanzen in den vier ausgewählten repräsentativen Harnen nachgewiesen werden. Daß nicht alle in Abb. 1 angegebenen Substanzen wiedergefunden wurden, erklärt sich daraus, daß der Abb. 1 die Sichtung einer Serie von 148 Harnen zu Grunde lag.

Die Position von Nr. 8 muß gegenüber Abb. 1 etwas korrigiert werden. Nr. 8 sitzt niedriger als dort angegeben, nur wenig oberhalb von Nr. 13 (vgl. Abb. 3 und 4). In der Position von Nr. 3 und 5 und deren Umgebung (Abb. 1) können, wie im folgenden Abschnitt II noch gezeigt wird, eine große Zahl von Substanzen sitzen, welche alle blaue bis blauviolette Reaktionen geben. Die Individualität von Nr. 3 und 5 ist in Frage gestellt. Die Bezeichnung Nr. 3 soll jetzt für diejenige Substanz reserviert werden, die in charakteristischer Weise nach längerer Zeit eine rotviolette Färbung entwickelt. Einige der in der Tab. 2 wiedergegebenen Substanzen konnten bereits früher von D e c k e r (2-5) identifiziert werden, nämlich Indikan, Harnstoff, Tryptophan und Indolelessigsäure. Eine Anzahl weiterer wurde ebenfalls durch D e c k e r (2,3) mit dem Stoffwechsel bekannter Substanzen verbunden, so das Skatolrot und das sogen. Skatolblau. Im folgenden Abschnitt II dieser Arbeit wird eine Anzahl weiterer Substanzen, nämlich Nr. 4, 5a, 8 und 10 als Stoffwechselprodukte der Indol-

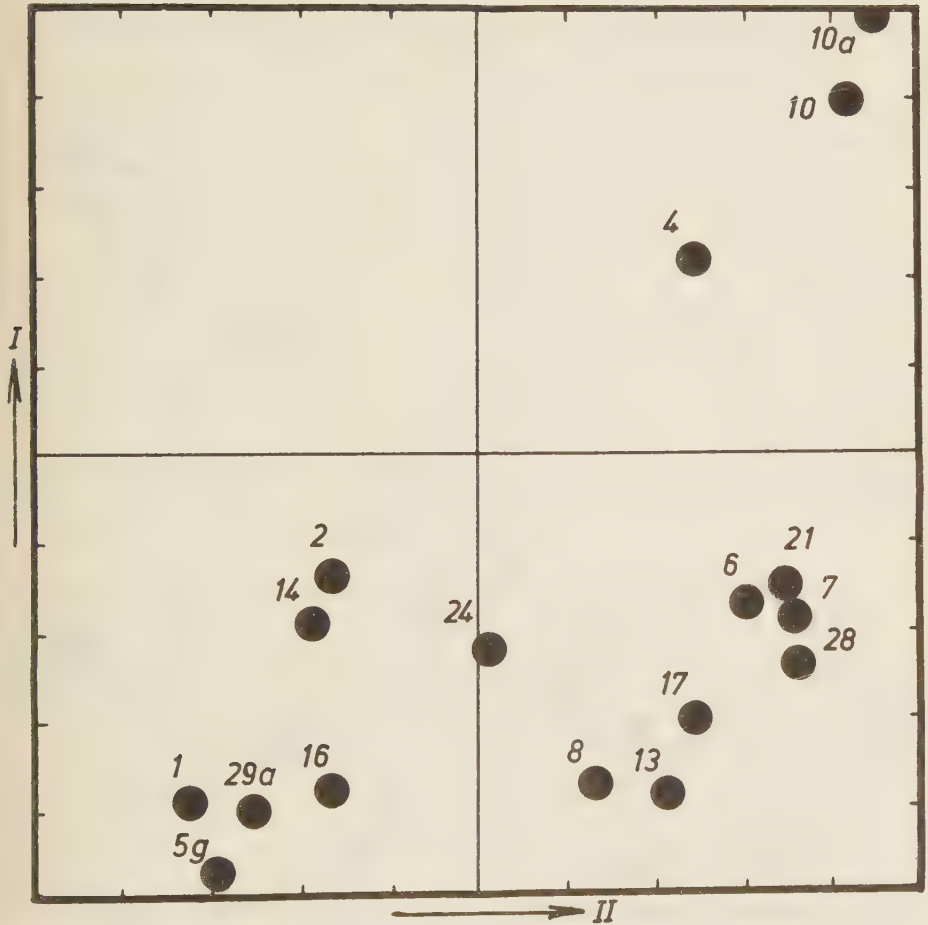


Abb. 4

Positionen von in normalen sowie pathologischen Harnen stets oder sehr häufig vorkommenden Ehrlich-positiven Substanzen.

Zweidimensionales PC-gramm mit dem Lösungsmittelpaar I/II

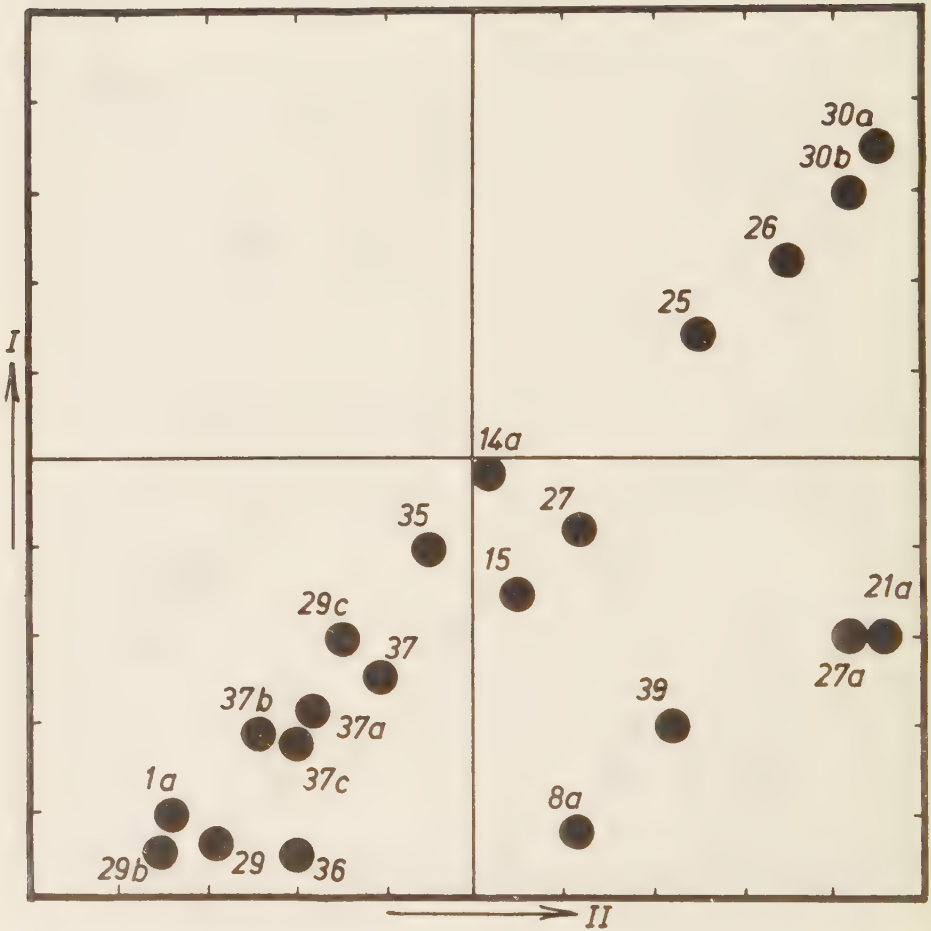


Abb. 5

Positionen von seltener vorkommenden, vorwiegend in pathologischen Harnen nachgewiesenen Ehrlich-positiven Substanzen.

Zweidimensionales PC-gramm mit dem Lösungsmittelpaar I/II

essigsäure charakterisiert. Schließlich wird vermutet, daß Nr. 10a mit hohen Rf-Werten in allen Lösungsmitteln Indol ist. Ebenso ist Nr. 29a vermutlich Allantoin, doch ist dieses noch durch Misch- und Parallelchromatogramme sicherzustellen. Nr. 17a und 17b sind offensichtlich zwei sehr nahe verwandte Substanzen, denn sie geben genau die gleiche Farbreaktion und werden nur vom Lösungsmittel IV in zwei nahe beieinander liegende Flecke aufgespalten. Das gleiche gilt für Skatolrot, welches durch keines der vier verwendeten Lösungsmittel aufgespalten wird, wohl aber durch wassergesättigtes Methyläthylketon. In solchen Fällen einer sich im pc-graphischen Verhalten demonstrierenden außergewöhnlich nahen Verwandtschaft von Stoffpaaren muß man an die Möglichkeit denken, daß es sich um Enantiomerenpaare handelt, die sich wie D a g l i e s h (9) am Beispiel des Kynurenins gezeigt hat, gelegentlich infolge der optischen Aktivität der Zellulose in nahe beieinander liegende Flecke aufspalten lassen.

Fast alle der aufgeführten Substanzen sind jetzt pc-graphisch soweit charakterisiert, daß nunmehr an die Isolierung und Konstitutionsaufklärung der noch unbekannt gebliebenen Stoffe gedacht werden kann.

Zusammenfassend läßt sich über die simultane vierdimensionale PC-graphie folgendes aussagen: Jede Substanz wird bei diesem Verfahren in sechs selbständigen zweidimensionalen PC-grammen mit jeweils verschiedenen Lösungsmittelkombinationen aus vier Lösungsmitteln wiedergefunden und durch je vier Rf-Werte charakterisiert. Durch diese sechsfache in immer neuen Kombinationen sich wechselseitig kontrollierende Information kann auch in sehr komplizierten Gemischen jede Substanz mit großer Sicherheit bezüglich ihrer Individualität und ihrer Rf-Werte erfaßt werden. In der Sprache der Informationslehre ausgedrückt, wird so eine optimale Redundanz der entnommenen Information erzielt.

Es werden auf diese Weise weitaus besser gesicherte Ergebnisse erzielt als etwa durch sechsfache Wiederholung eines zwei- oder gar eindimensionalen PC-grammes. Durch Wiederholung werden nämlich nur Fingerabdrücke und ähnliche "Phantome" eliminiert, während alle systematischen dem jeweiligen Fall eigenen Unvollkommenheiten sich unverändert wiederholen. Dazu gehört die gegenseitige Überdeckung zweier Substanzen, die Beeinflussung der Rf-Werte durch benachbart liegende Ballaststoffe, die besonders in eindimensionalen PC-grammen sehr störend ist, aber auch in zweidimensionalen oft genug vorkommt. Schließlich gehören dazu systematische Verzerrungen bei zweidimensionalen PC-grammen durch den vom ersten Lösungsmittel hochgetriebenen Schlierrand.

Auch wenn in einem oder mehreren der sechs PC-gramme infolge Störung oder Überdeckung eine Substanz nicht identifizierbar ist, gelingt unter Zuhilfenahme der übrigen PC-gramme eine immer noch ausreichende Charakterisierung.

Die Differenzierung nach vier Rf-Werten mit diesem Verfahren ist so signifikant, daß auch dann keine Überschneidungen auftraten, als die Rf Werte auf ganze Zehntel abgerundet wurden. Je vier solche abgerundete Rf-Werte bilden eine Kennziffer, welche jede der Substanzen weitgehend charakterisiert. Wie aus dem in Tab. 3 so zusammengestellten Kennzifferverzeichnis der in Abb. 3 dargestellten Substanzen zu ersehen ist, lassen sich durch solche vierstelligen Kennziffern mit 2 Ausnahmen Nr. 1 und 1a, und Nr. 30b und 10, die durch nachgestellte Buchstaben unterschieden werden müssen, sämtliche 42 Substanzen eindeutig auseinanderhalten. Im Falle dieser beiden Überschneidungen unterscheiden sich die Substanzen durch ihre Farbreaktion; blau und rot bzw. gelb und blau!

Zusammenfassung

Zweiundvierzig aromatische und heterocyklische Harninhaltsstoffe, welche mit Ehrlich's Aldehydreagens blaue, rote oder gelbe Reaktionsprodukte geben, werden nach Adsorption an Kohle im Harn und nachfolgende Elution, durch simultane vierdimensionale Papierchromatographie mit sechs Kombinationen von vier Lösungsmitteln nachgewiesen und durch je vier Rf-Werte charakterisiert.

Auf Grund der, aus den vier Rf-Werten für jede Substanz zusammengestellten Kennziffern lassen sich die 42 nachgewiesenen Harninhaltsstoffe eindeutig voneinander unterscheiden.

TABELLE 3

Kenn- ziffer	Nr. aus Abb. 3	Kenn- ziffer	Nr. aus Abb. 3	Kenn- ziffer	Nr. aus Abb. 3	Kenn- ziffer	Nr. aus Abb. 3
X322	5 d	1321	36	2744	17 a	3959	27 a
X421	29 d	1332	3	2745	17 b	4477	2
X422	5 e	1421	5 b	2845	6	4565	14 a
X444	5 a	1443	16	2948	28	4577	35
0211	5 f	1542	8 a	2SSZ	7 a	4666	27
0212	5 g	1632	8	3365	29 c	5976	31 a
0311	5 c	1728	13	3466	14	6878	25
1212	29	2353	37 b	3544	24	7879	4
1222	29 b	2447	37 c	3666	15	7888	26
1233	1	2454	37 a	393Z	21	897Z	30 a
1233a	1 a	2464	37	394Z	7	999Z	30 b
1314	29 a	2732	39	3955	21 a	999Z a	10
						9Z9Z	10 a

Kennziffern (abgerundete Rf-Werte mal 10^1 in den Lösungsmitteln I-IV) der Substanzen in Abb. 3 und einiger im Abschnitt II beschriebener Stoffwechselproduk-
te der Indolessigsäure: Nr. 5 b-f und 7 a.

X = Verdeckt; S = Streifen; Z = Rf 0,95-1,00;

Abweichende Abrundung bei

0	(Rf 0,00-0,03)
1	(Rf 0,04-0,13)
2	(Rf 0,14-0,23)
3	(Rf 0,24-0,34)
9	(Rf 0,85-0,95)

II. ÜBER DEN STOFFWECHSEL DER INDOLESSIGSÄURE BEIM MENSCHEN

Die Indolessigsäure und einige ihrer Stoffwechselprodukte wurden bereits von Decker (3) und Becke (6) auf Grund ihrer pc-graphischen Untersuchungen von menschlichen und Hunde-Harnen beschrieben. Von Edw ins und L a i d l a w (12) wurde nach Verfütterung von Indolessigsäure im Hundeharn Indolacetursäure nachgewiesen und isoliert. Auch D e c k e r (3) fand regelmäßig Indolacetursäure im Hundeharn, konnte sie jedoch im menschlichen Harn bis jetzt nicht nachweisen. Hingegen wird Indolessigsäure in normalen sowie pathologischen menschlichen Harnen nie vermißt. Ebenso finden sich unter den mit Ehrlich's Aldehyd im menschlichen Harn nachweisbaren Substanzen stets Tryptophan, sowie Indol- und Skatolderivate. Die Annahme, daß die genannten Substanzen einer gemeinsamen Stoffwechselreihe angehören, ist jedoch nicht gerechtfertigt, wie eingangs bereits erwähnt wurde. Vielmehr wird nach Belastung mit jeder dieser Substanzen eine wohldefinierte Gruppe von Metaboliten im Harn vorgefunden.

Die Aufgabe der vorliegenden Untersuchung war die Stoffwechselprodukte der Indolessigsäure mittels simultaner vierdimensionaler PC-graphie näher zu charakterisieren. Zu diesem Zweck wurde der Harn nach peroraler Belastung mit 2 g Indolessigsäure im Selbstversuch untersucht.

ERGEBNISSE

Die im simultanen mehrdimensionalen Verfahren hergestellten PC-gramme dieser Versuchsreihe werden im Diagramm der Abb. 6 wiedergegeben. Die in den Original-PC-grammen verstärkt hervortretende Indolessigsäure und ihre Metaboliten werden durch kräftigere Umrandung gekennzeichnet.

Zur Orientierung wurden in den Diagrammen die Positionen einiger weiterer stets (Nr. 1, 2, 14, 24) bzw. sehr häufig (Nr. 6, 10a, 13, 17) im menschlichen Harn vorkommenden Substanzen mitgezeichnet und die ersteren durch mittelständige Punkte markiert.

In Tab. 4 sind die nachgewiesenen Substanzen mit jeweils vier Rf-Werten aufgeführt, die den Original-PC-grammen in der in Abschnitt I geschilderten Weise entnommen wurden. Bei denjenigen Substanzen, die auch in normalen Harnen vorkommen und die im vorangegangenen Abschnitt Tab. 2 aufgeführt wurden,

sind die dort gefundenen Rf-Werte in Klammern hinzugefügt. Die kleinen Abweichungen demonstrieren sehr schön die Streuung der ohne besondere Kautele gemessenen Rf-Werte. Der Vergleich mit den Umzeichnungen zeigt weiter, daß solche Streuungen, da sie alle Rf-Werte in kohärenter Weise betreffen, die Identifizierung praktisch nicht zu stören vermögen.

DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Unter den nach Indolessigsäurezufuhr im Harn nachgewiesenen Substanzen befinden sich:

1. die direkten in großer Menge auftretenden Stoffwechselprodukte der Indol-essigsäure: Nr. 7, 8, 5a, 4, 10 und 7a. Mit Ausnahme von 7a wurden diese Substanzen auch in normalen Harnen ohne vorangegangene Indolessigsäure-Belastung, sowie in pathologischen Harnen gefunden, davon 7 und 8 regelmäßig;
2. eine Gruppe von Substanzen mit blauer Farbreaktion Nr. 5b, 5c, 5d, 5e, 5g, die jedoch nicht in einer so großen Konzentration wie die unter 1. genannten auftreten und in normalen sowie pathologischen Harnen bis jetzt nicht mit Sicherheit identifiziert wurden. Auch diese Substanzen sind daher wohl als von der Indol-essigsäure abstammend zu betrachten, spielen jedoch offensichtlich in deren Stoffwechsel keine größere Rolle.
3. Substanzen, die auch ohne Indolessigsäure-Belastung stets oder zumindest sehr häufig zu finden sind: Nr. 1, 2, 6, 10a, 13, 14, 17 und 24.
Nr. 7 ist Indolessigsäure selbst (3), bezüglich Nr. 5a und Nr. 8, sowie der Substanzen der Gruppe 2., konnten wir bisher lediglich nachweisen, daß sie nicht mit Indolacetursäure identisch sind (3), letztere wurde nämlich aus Hundeharn isoliert (12). Das Hauptstoffwechselprodukt der Indolessigsäure beim Hund ist aber mit keinem der unter 1. genannten Substanzen identisch. Mit dem mehrdimensionalen Verfahren haben wir es noch nicht charakterisiert, im System I/II sitzt es zwischen Nr. 8 und Nr. 7. Hingegen könnte es sich um ein entsprechendes Glucuronsäurederivat handeln. Die Zahl der Metaboliten, die aus der Indolessigsäure, sowie aus mehreren anderen von Decker untersuchten Substanzen entstehen und zwar ausweislich der blauen Farbreaktion mit Ehrlich's Aldehyd ohne wesentliche Umwandlung des Indolkernes, läßt vermuten, daß der Organismus außer den wenigen bekannten Kupplungsmöglichkeiten mit Glucuronsäure, Glykokoll, Schwefelsäure u.a., noch über eine große Zahl weiterer Möglichkeiten verfügt.

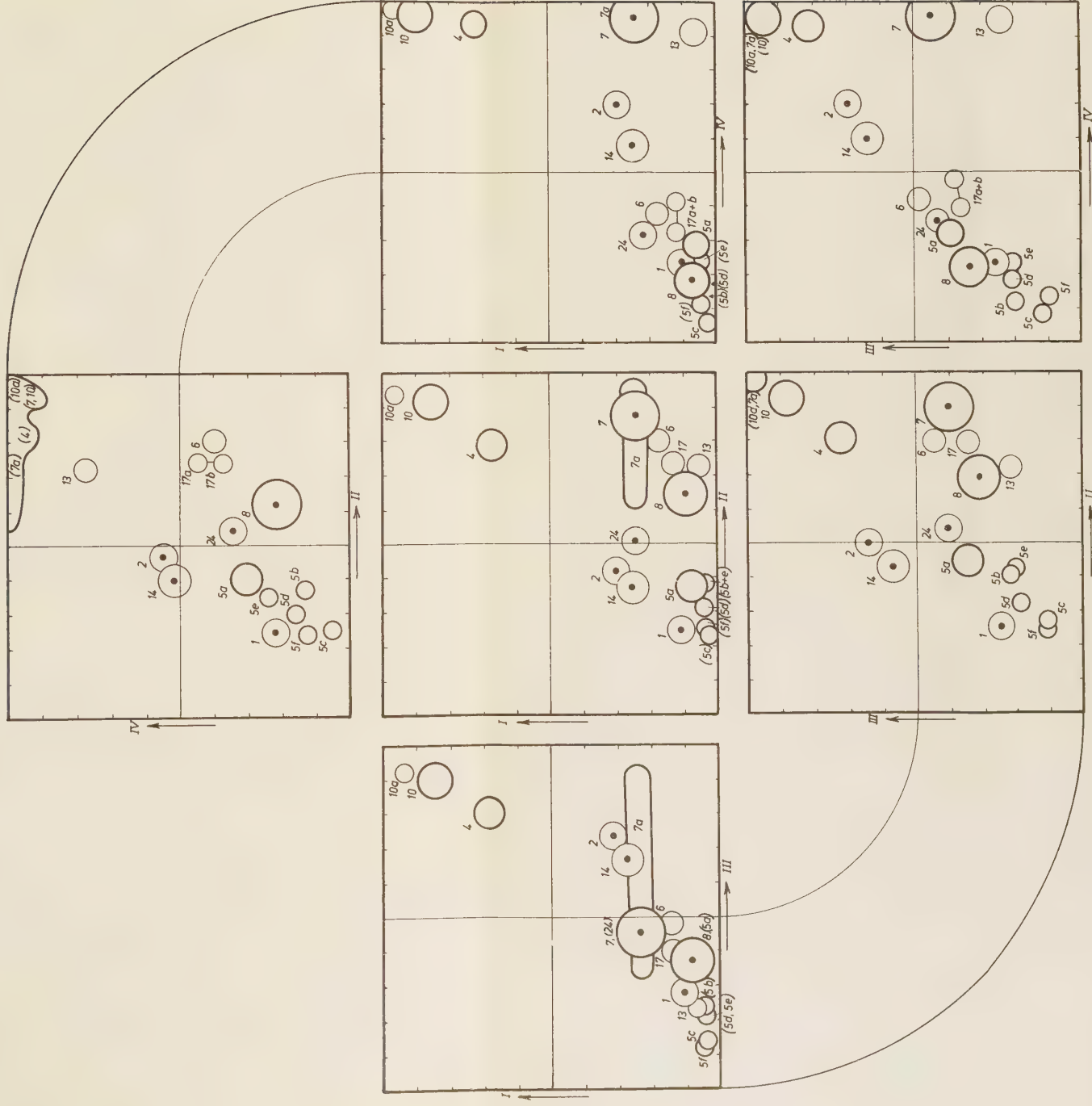


Abb. 6

Charakterisierung Ehrlich-positiver Substanzen im menschlichen Harn nach Indol-essigsäure (IE) - Belastung durch "simultane vierdimensionale PC-graphie".

Stark umrandet: IE-Metaboliten, Mittelpunktsmarkierung: auch im normalen Harn regelmäßig vorkommend. Soweit Nummernbezeichnung eingeklammert, wurde die Position aus dem benachbarten PC-gramm abgeleitet, da wegen Kollision mehrerer

metaboliten im Original nicht sicher identifizierbar.

++) Mittl. Rf-Wert $\times 10^2$ in Lösungsmittel Nr.

I		II		III		IV	
11	(12)	25	(23)	27	(27)	23	(26)
30	(35)	46	(33-46)	69	(67)	55-70	(68)
70	(74)	81	(79)	78	(76)	95	(95)
8	(Ø)	41	(42)	38	(40)	31	(37)
4	(-)	38	(-)	23	(-)	12	(-)
2	(-)	25	(-)	10	(-)	7	(-)
(Ø)	(-)	31	(-)	20	(-)	17	(-)
(Ø)	(-)	38	(-)	20	(-)	23	(-)
3	(-)	24	(-)	10	(-)	12	(-)
17	(22)	80	(81)	47	(44)	44	(44-60)
25	(30)	90	(87)	44	(41)	97	(96)
23	(-)	59-97	(-)	32-93	(-)	ca. 97	(-)
9	(11)	65	(63)	35	(34)	21	(24)
87	(90)	94	(91)	91	(91)	97	(96)
97	(100)	96	(98)	96	(95)	97	(100)
8	(11)	72	(72)	23	(24)	78-95	(83)
27	(30)	40	(37)	63	(60)	57	(52)
13	(18)	75	(76)	38	(38)	36	(32-47)
13	(18)	75	(76)	38	(38)	45	(40-55)
23	(26)	53	(54)	43	(43)	34	(36)

ung (2g). Nachgewiesen durch mehrdimensionale PC-nischen.

0,1 Rf-Extremwerte.

Über die Natur der Substanzen Nr. 4 und Nr. 10 können wir uns noch keine Vorstellung machen. Wie in Vorversuchen mit dem Harn nach Indolessigsäure-Belastung festgestellt werden konnte, sind beide Stoffe überraschender Weise nicht mit Essigester aus essigsaurem Harn ausschüttelbar; dagegen läßt sich Nr. 4 aus ammoniakalischem Harn mit Essigester extrahieren. Es wird daher vermutet, daß Nr. 4 basischen Charakter hat. Da Nr. 10 weder aus sauerem noch aus ammoniakalischem Harn ausschüttelbar ist, seiner Position in den PC-grammen nach aber zweifellos eine stark lipophile Substanz darstellt, wird vermutet, daß diese Substanz nicht im nativen Harn vorkommt, sondern sich erst bei der Aufarbeitung des Harnes über Kohleadsorption bildet. Die Tatsache, daß in allen Lösungsmittelpaaren der durchgeführten mehrdimensionalen PC-graphie die Lagebeziehung von Nr. 4 und Nr. 10 außerordentlich konstant ist, läßt vermuten, daß Nr. 4 und Nr. 10 sehr ähnliche Konstitution besitzen.

Zusammenfassung

Nach Indolessigsäure-Belastung am Menschen werden durch simultane mehrdimensionale Papierchromatographie sechs in größerer Menge und weitere fünf in kleinerer Menge im Harn auftretende Stoffwechselprodukte der Indolessigsäure beschrieben. Fünf der ersteren einschließlich der Indolessigsäure selbst sind identisch mit Substanzen, die auch ohne Indolessigsäure-Belastung im menschlichen Harn vorkommen.

Die Rf-Werte der genannten 11 Indolessigsäure-Metaboliten werden tabellarisch zusammengefaßt und ihre Positionen in zweidimensionalen Papierchromatogrammen mit Kombinationen von vier Lösungsmitteln als Diagramm wiedergegeben zusammen mit häufig vorkommenden anderen Harninhaltsstoffen als Leitsubstanzen.

III. ÜBER DIE CHROMOGENE DER UROROSEINREAKTION IM HARN

Im folgenden werden die im menschlichen Harn nachweisbaren Chromogene der Uroroseinreaktion pc-graphisch analysiert und beschrieben.

Die Uroroseinreaktion wurde von N e n c k i und S i e b e r (10) entdeckt.

Drei Chromogene dieser Reaktion, von denen zwei als Indolessigsäure und Skatolrot erkannt wurden, sind schon von D e c k e r (3) beschrieben worden. Es

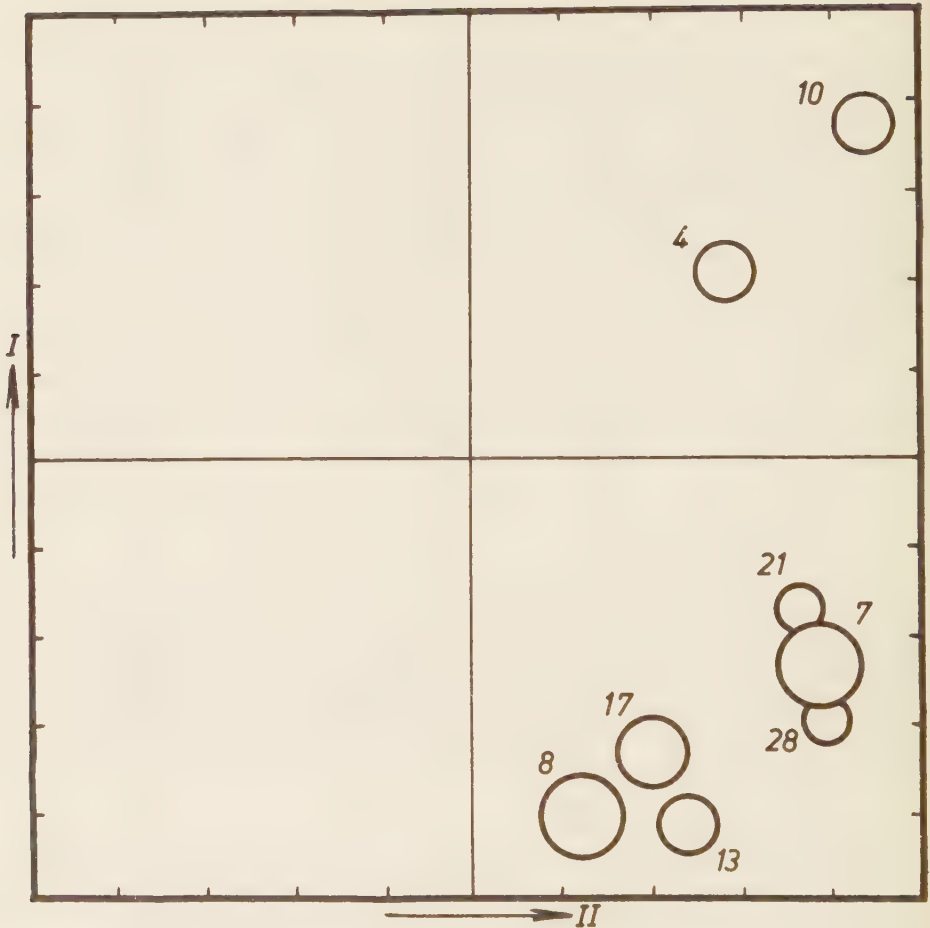


Abb.7

Positionen von Harninhaltsstoffen, die mit Nitrit-Salzsäure reagieren, darunter der Chromogene der Uroroseinreaktion Nr.7,8,17 und 21. - Färbung: 7 (Indolessigsäure (IE)) und 8 (IE-Metabolit) rosarot; 4 und 10 (IE-Metaboliten) bräunlich, zuweilen rot; 21 (Skatolrot) rot; 17 (unbek.) lachsrot; 13 (unbek.) schwach bräunlich; 28 (unbek.) gelblich.

wurde bereits vermutet, daß außer diesen drei nachgewiesenen Chromogenen noch einige andere der Harninhaltsstoffe an der Uroroseinreaktion beteiligt sind. In dieser Untersuchungsreihe wird aufgezeigt, daß dies tatsächlich der Fall ist. Diese Feststellung beruht auf der Untersuchung von 140 normalen und pathologischen Harnen, die in der unter Methodik angegebenen Arbeitsweise vorbereitet wurden und deren Kohleeluate im zweidimensionalen Verfahren mit dem Lösungsmittelpaar I/II (Butanol-Ammoniak/Isopropylalkohol-Eisessig) gefahren wurden. Die Entwicklung der uroroseinpositiven Substanzen in den PC-grammen erfolgte durch Besprühen mit 0,5 %iger salzsaurer Natriumnitritlösung.

ERGEBNISSE

In Abb. 7 sind die nach Besprühen mit der angegebenen Nitritlösung erscheinenden rosaroten und roten uroroseinpositiven Substanzflecke, sowie bei der gleichen Behandlung mit bräunlichem oder gelblichem Farbton herauskommenen Flecke in ihrer Lagebeziehung zueinander wiedergegeben, wie sie bei der Sichtung in zweidimensionalen PC-grammen von 140 pathologischen und normalen Harnen gefunden wurden.

Da diese Substanzen sämtlich auch mit Ehrlich's Aldehyd Farbreaktionen geben und somit als rote, violette, blaue, braune und gelbe Flecke in Abb. 1 und Abb. 3 im Abschnitt I wiederzufinden sind, wurde von dort die Nummerbezeichnung für das Diagramm der Abb. 7 übernommen. Die bei der Nitritentwicklung erscheinenden Farben dieser Flecke sind dort mit aufgeführt.

Die zugehörigen Rf-Werte können der Tab. 4 entnommen werden.

DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Eine erneute Sichtung von 140 Harnen auf uroroseinpositive Substanzen mit dem Lösungsmittelsystem I/II bestätigte wiederum das häufige Vorkommen von Nr. 7, 8 und 21 als Chromogene der Uroroseinreaktion.

Bei der Untersuchung des Harnes nach Indolelessigsäure-Belastung wurde festgestellt, daß auch Nr. 4 und Nr. 10 eine rote Uroroseinreaktion geben können, was

bisher übersehen wurde, da man in der Regel nur eine schwach gelbliche Färbung erhält. Nur unter bestimmten, noch nicht reproduzierbar beherrschten Konzentrationsverhältnissen an Nitrit und Säure tritt eine rote Färbung auf. Ferner wurde festgestellt, daß auch Nr. 17 zu den uroroseinpositiven Substanzen gehört. Nr. 17 kommt sowohl mit Nitrit als auch häufig beim längeren Liegen an der salzsauren Laboratoriumsluft mit lachsrosa Farbe, die sich als außerordentlich beständig erweist, heraus; die gleiche Färbung findet man auch nach Besprühen mit Ehrlich's Aldehyd und mit Obermayer's Reagens. Das Extinktionsmaximum der Färbung liegt bei 510_{mu}.

Es wurde bereits früher von D e c k e r (3) vermutet, daß die von A r n o l d (13) festgestellten Abweichungen (Extinktionsband von 500 bis 517_{mu}) im Spektrum der Uroroseinreaktion auf verschiedene Mengenverhältnisse der Urorosein-Chromogene zurückzuführen sind. Nun kann hinzugefügt werden, daß die von A r n o l d als "Nephrorosein" bezeichnete Variante der Uroroseinreaktion vielleicht durch das Vorkommen größerer Mengen von Nr. 17 erklärt werden kann. Auch unter den hier untersuchten Harnen fanden sich solche, in denen die Substanz Nr. 17 in außerordentlich großer Menge vorkam.

Nr. 13 und Nr. 28 sind nur der Vollständigkeit halber aufgeführt, sie färben sich mit Nitrit nur schwach bräunlich bzw. gelblich.

Als Chromogene der Uroroseinreaktion beim Menschen kommen demnach Indolessigsäure (Nr. 7), der Indolessigsäure-Metabolit Nr. 8, Skatolrot (Nr. 21), die uns noch nicht näher bekannte Substanz Nr. 17, sowie unter Umständen die beiden Indolessigsäure-Metaboliten Nr. 4 und Nr. 10 vor.

Zusammenfassung

140 normale und pathologische Harnen wurden durch zweidimensionale Papierchromatographie auf Chromogene der Uroroseinreaktion untersucht.

Sechs Chromogene: Indolessigsäure, drei ihrer Metaboliten, Skatolrot und eine Substanz unbekannter Gruppenzugehörigkeit, welche lachsrosa Färbung liefert (Nr. 17), Extinktionsmaximum 510_{mu}, werden als Chromogene erkannt und mit früher beschriebenen, mit Ehrlich's Aldehyd reagierenden Substanzen identifiziert.

Nr. 17 ist vermutlich das Chromogen des sogenannten "Nephrorosein" von A r n o l d .

LITERATURVERZEICHNIS

1. P. Decker, W. Riffart und G. Oberneder, Naturwissenschaften 38, 288 (1951)
2. P. Decker, vorgetragen a.d. Vers. d. Physiol. chem. Ges. in Homburg/S. am 30.9.1953, Ber. ges. Physiol. exp. Pharmakol. 162, 376 (1954)
3. P. Decker, Z. ges. inn. Med. Grenzgebiete 9, 966 (1954)
4. P. Decker, Hoppe-Seyler's Z. f. physiol. Chem. 300, 245 (1955)
5. P. Decker und I. Sano, Hoppe-Seyler's Z. f. physiol. Chem. 300, 252 (1955)
6. H. Becke, Inaugural Dissertation, Universität München 1954
7. A. Ellinger, Hoppe-Seyler's Z. f. physiol. Chem. 39, 44 (1903)
8. E. Salkowski, Hoppe-Seyler's Z. f. physiol. Chem. 9, 23 (1885)
9. C. E. Dagliesh und Mitarb., Biochemical J. 52, 3 (1952); 53, 513 (1953); 56, 458 (1954); Nature 168, 20 (1951)
10. M. Nencki und N. Sieber, J. prakt. Chem. (2), 126, 333 (1882)
11. R. I. Williams und H. Kirby, Science 107, 481 (1948)
12. A. J. Edwins und P. P. Laidlaw, Biochem. J., London 7, 18 (1913)
13. V. Arnold, Hoppe-Seyler's Z. f. physiol. Chem. 71, 3 (1911)

Herrn Prof. Dr. Dr. K. D i r r , Direktor des Laboratoriums der II. Medizinischen Universitätsklinik München, danke ich für die Überlassung des Themas und die großzügige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Auch Herrn Priv. Doz. Dr. P. D e c k e r möchte ich an dieser Stelle für seine wertvollen Anregungen, Ratschläge und technischen Hinweise während meiner Arbeit herzlichst danken.

LEBENS LAUF

Als Tochter des wirklichen Staatsrates Gouvernementsarztes Dr. med. Titus K i k o d s e und seiner Ehefrau Nino Kikodse, geb. Barataschwili, wurde ich am 2.10.1909 in Tiflis, Georgien geboren. Bis zu meinem 16-ten Lebensjahr besuchte ich das Mädchen-Gymnasium in Tiflis. Seit 1926 lebe ich in Deutschland.

1929 legte ich an der Universität Berlin die Ergänzungsprüfung zum deutschen Abitur ab. 1930 bis 1936 studierte ich Chemie an der Technischen Hochschule Berlin-Charlottenburg, wo ich 1937 das Diplomexamen bestand. 1937 bis Kriegsende war ich am Braunkohlenforschungsinstitut der T.H. Berlin als wissenschaftliche Assistentin tätig. Vom Sommersemester 1948 an studierte ich Medizin an der Universität München und legte hier im April 1954 das medizinische Staatsexamen ab. Anschließend absolvierte ich meine Pflicht-assistentenzeit an der II. Medizinischen Universitätsklinik in München. Dezember 1955 bis September 1956 war ich im Ambulatorium, sowie im Laboratorium für Staublungen- und Kreislaufdiagnostik der Universitäts-Poliklinik tätig. Seit Oktober 1956 gehöre ich als Assistentin der II. Medizinischen Universitäts-Klinik München an, wo ich im Laboratorium von Herrn Prof. Dr. Dr. K. Dirr den experimentellen Teil meiner Dissertation durchführen konnte.

München, den 25.6.1959

